

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
18 novembre 2004 (18.11.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/099776 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/543, B01J 19/00, G02B 1/10(FR). GERMAIN, Chantal [FR/FR]; 6, rue des Mouettes,
F-42210 Montrond-les-Bains (FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/001088(74) Mandataire : LEHU, Jean; BREVATOME, 3, rue du
Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 6 mai 2004 (06.05.2004)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
03/50146 6 mai 2003 (06.05.2003) FR(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
MISSARIAT A L'ÉNERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).
THALES ANGENIEUX SA [FR/FR]; Boulevard Ravel
de Malval, F-42570 Saint Heand (FR).(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CHATON,
Patrick [FR/FR]; "Loutre", F-38570 Theys (FR). GETIN,
Stéphane [FR/FR]; 41, rue des Eaux Claires, F-38100
Grenoble (FR). VINET, Françoise [FR/FR]; 22, boule-
vard Edouard Rey, F-38000 Grenoble (FR). PEGON,
Philippe [FR/FR]; 3, rue Liogier, F-42100 Saint Etienne

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: BIOCHIP SUPPORT COMPRISING THIN LAYERS OF SOL-GEL MATERIAL AND PRODUCTION METHOD
THEREOF(54) Titre : SUPPORT DE BIOPUCE UTILISANT DES COUCHES MINCES DE MATERIAU SOL GEL ET PROCEDE DE
REALISATION

(57) Abstract: The invention relates to a biochip support. The inventive support consists of a substrate bearing at least one porous layer of material on a first face, whereby the layer is intended to ensure the fixing of biological molecules on and inside said layer. The support is characterised in that the layer is a thin optical layer of material prepared by sol-gel process, having a refractive index which is less than that of the substrate. The invention also relates to a method of grafting biological molecules to the surface of, and inside the thin layer of material prepared by sol-gel process on the first face of the biochip support. The aforementioned method comprises the following steps: preparation of a sol which is intended to provide the sol-gel material; incorporation of bio-molecules in the material during the preparation thereof; grafting of bio-molecules in the material during the preparation thereof; deposition of a thin layer of said sol on the first face of the substrate; and production of the thin layer of sol-gel material from the thin layer of sol. Moreover, one particular grafting method also comprises a step involving the structuring of the thin layer of sol-gel material in order to produce a network of pits and bumps over all or part of the biochip support.

(57) Abrégé : L'invention concerne un support pour biopuce comprenant un substrat supportant, sur une première face, au moins une couche poreuse de matériau, ladite couche étant destinée à assurer la fixation de molécules biologiques sur ladite couche et dans son volume, ledit support étant caractérisé en ce que ladite couche est une couche mince optique de matériau préparé par voie sol-gel et dont l'indice de réfraction est inférieur à l'indice de réfraction du substrat. L'invention concerne également un procédé de greffage de molécules biologiques sur et dans la couche mince de matériau préparé par voie sol-gel sur la première face du support pour biopuce. Ce procédé comprend les étapes suivantes : - préparation d'un sol destiné à fournir le matériau sol-gel, - incorporation des bio-molécules dans le matériau au cours de sa préparation, - greffage des bio-molécules dans le matériau au cours de sa préparation, - dépôt d'une couche mince dudit sol sur la première face du substrat, - obtention de la couche mince de matériau sol-gel à partir de la couche mince de sol. Enfin, un mode de réalisation particulier du procédé de greffage comprend en outre une étape de structuration de la couche mince de matériau sol-gel pour obtenir un réseau de plots ou de cuvettes sur tout ou partie du support de biopuce.



— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**SUPPORT DE BIOPUCE UTILISANT DES COUCHES MINCES
DE MATERIAU SOL GEL ET PROCEDE DE REALISATION**

DESCRIPTION

5 DOMAINE TECHNIQUE

L'invention a trait au domaine des microsystemes biologiques. Plus particulièrement, elle concerne la réalisation d'un support de biopuce dont la détection est basée sur la collection d'un signal de
10 fluorescence.

Ce support de biopuce ou biocapteur peut être utilisé dans le cadre de la réalisation de supports biopuces compatibles avec le greffage d'acides nucléiques (biopuces à ADN, biopuces à ARN), d'acides
15 aminés (puces à protéines, puces immunologiques), ainsi que les biopuces cellulaires utilisées notamment dans les études de la transfection ou les études du chimiotactisme.

Le domaine de l'invention s'étend aussi à
20 tous types de réactions de reconnaissance moléculaires (anticorps/antigène, protéines-sucres...).

L'invention concerne également un procédé de greffage de molécules biologiques dans le support selon l'invention.

25

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

La technologie des biopuces ou biocapteurs à ADN est très utilisée dans les analyses biomédicales, comme par exemple dans l'expression des gènes, la
30 détection de mutations ou de polymorphisme, le

séquençage et la découverte de gènes (voir le document [1] référencé à la fin de cette description).

Ces biopuces sont constituées de réseaux microscopiques de molécules biologiques immobilisées sur des supports solides. Plusieurs approches peuvent être utilisées pour la préparation de ces microréseaux.

Tout d'abord, les molécules biologiques peuvent être directement synthétisées sur un substrat (voir les documents [2], [3], [4], [5]). Cependant, en opérant de cette manière, on obtient des oligonucléotides qui présentent des longueurs se situant dans un domaine de 10 à 60 mères. La limitation de la longueur maximale des sondes ainsi synthétisées constitue le principal problème de cette technologie.

Les molécules biologiques peuvent également être pré-synthétisées, puis déposées sur des zones délimitées du support par l'intermédiaire de microrobots qui seront soit passifs (type « pin »), soit actifs (type piézoélectrique ou type à jet d'encre) (voir le document [6]). Une grande gamme de molécules peut ainsi être déposée par cette méthode, comme par exemple les oligonucléotides, les produits issus d'amplification PCR d'ADN et les protéines.

De la même manière, différentes approches sont possibles pour coupler les molécules biologiques avec le support.

On peut utiliser le couplage électrostatique sur polyLysine (document [7]) ou les interactions hydrophobes (document [8]). Cependant, ce type de liaison ne permet pas une analyse précise dans

certaines conditions de température ou de stringence des solutions d'hybridation.

On peut aussi coupler les molécules biologiques au support à l'aide de liaisons covalentes.

5 Cette approche permet de mieux optimiser les conditions d'hybridation et donc la sensibilité des microréseaux, puisque les molécules sont greffées sur le support de manière covalente et irréversible (documents [9], [10], [11], [12]).

10 On peut également effectuer ce couplage avec des oligonucléotides modifiés en 5' par un groupement pyrrole que l'on dépose par électrocopolymérisation avec du pyrrole sur des électrodes (document [13]).

15 Cependant, quelles que soient les méthodes décrites précédemment, le greffage se fait en deux dimensions sur un support plan.

Afin d'augmenter la densité locale des
20 molécules biologiques sur les biopuces, A. Mirzabekov a proposé d'utiliser des gels de polyacrylamides et de greffer les molécules en trois dimensions dans le volume de ce matériau (documents [14], [15], [16]). Ce principe est aussi utilisé pour des réactions
25 enzymatiques in situ localisées, des reconnaissances antigènes/anticorps (document [17]), des amplifications PCR d'oligonucléotides immobilisées (document [18]) ou la détection de la production de toxines bactériennes.

En utilisant les gels de polyacrylamides
30 tels que décrit dans le brevet déposé par A. Mirzabekov (document [19]), on peut obtenir une densité de

biomolécules greffées plus importante que dans l'art antérieur. Mais, dans ce procédé, seules les réactions de la chimie organique sont utilisées pour coupler les biomolécules. En particulier, aucun agent de couplage
5 de type silane n'est utilisé pour greffer les biomolécules sur le gel.

Par ailleurs, on ne cherche pas à améliorer le signal de fluorescence émanant de la biopuce, ou plus particulièrement, le rapport [signal de
10 fluorescence/bruit]. En particulier, la monocouche de polyacrylamide n'a pas de fonction optique. En outre, cette monocouche est épaisse : elle a en effet une épaisseur d'environ 30 micromètres.

15 En ce qui concerne les matériaux sol-gel proprement dit, un certain nombre d'entre eux ont déjà été utilisés, principalement pour l'encapsulation de protéines et l'étude de leur fonctionnalité. Beaucoup de travaux sont actuellement publiés sur l'influence de
20 cette encapsulation sur la structure, la fonction, l'accessibilité, la conformation et la stabilité thermodynamiques des protéines (documents [20], [21], [22]). En particulier, on sait que la modification chimique appropriée des sol-gels permet un taux de
25 greffage covalent de protéines plus important et/ou l'amélioration des propriétés de stabilité. Des études comparées de stabilité d'anticorps immobilisés ont montré de meilleurs résultats sur sol-gel par rapport à un greffage covalent sur verre (voir le document [23]).
30 Par exemple, des sol-gels modifiés par des fonctions chloropropyl ou aminopropyl ont permis d'obtenir des

taux de protéines greffées deux à trois fois plus élevées que sur verre (document [24]).

Concernant ces études déjà publiées, on
5 peut faire quelques constats.

Tout d'abord, on remarque que le nombre de matériaux testés est très limité. En effet, les matériaux testés se limitent généralement à des matrices de silice épaisses (>1mm) préparées à base de
10 tétraéthoxysilane (TEOS) ou de tétraméthoxysilane (TMOS). Les variantes concernent plutôt la modification de la matrice par :

- l'introduction de polymère (PVA, PEG à bas poids moléculaire) (document [21]) ou la diffusion d'ions
15 pour jouer sur la polarité locale dans les pores,
- l'introduction de ligands pour fixer les biomolécules,
- la diffusion de solvant (par exemple le glycérol (document [22])) pour moduler la viscosité locale.

20 L'état de l'art n'a donc pas exploité pleinement la versatilité des propriétés microstructurales et physico-chimiques des matériaux sol-gel, ainsi que les différentes voies d'introduction et de greffage des biomolécules sur ou dans une couche
25 sol-gel.

Par ailleurs, l'intérêt potentiel des couches minces (c'est à dire, des couches d'une épaisseur de l'ordre de 0,1 μm) est évoqué plusieurs
30 fois mais n'a été prouvé jusqu'ici, semble-t-il, que par Zink et al. (document [25]). Néanmoins, cet intérêt

n'est aucunement motivé par la fonction optique de la couche. En particulier, les propriétés optiques des couches sol-gel utilisées pour l'encapsulation des protéines, qu'elles soient modifiées chimiquement ou pas, épaisses ($>1\text{ }\mu\text{m}$) ou minces, n'ont pas été étudiées ni quantifiées. Les auteurs se sont en effet contentés d'une transparence des gels suffisante pour permettre des mesures comparatives de signaux de fluorescence. L'idée de contribution des caractéristiques optiques de ces couches pour l'optimisation du signal de détection de la fluorescence n'est pas évoquée.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

Le but de l'invention est de fournir un support de biopuce pouvant avoir une densité locale de molécules biologiques greffées élevée par rapport à l'art antérieur, mais également permettant d'obtenir un signal de détection par fluorescence amélioré (plus précisément, un rapport signal à bruit de détection par fluorescence amélioré).

Ce but et d'autres encore sont atteints, conformément à l'invention, par un support pour biopuce comprenant un substrat supportant, sur une première face, au moins une couche poreuse de matériau, ladite couche étant destinée à assurer la fixation de molécules biologiques sur ladite couche et dans son volume, ledit support étant caractérisé en ce que ladite couche est une couche mince optique de matériau préparé par voie sol-gel et dont l'indice de réfraction est inférieur à l'indice de réfraction du substrat.

Les couches de matériaux obtenus par voie sol-gel présentent une surface développée de greffage importante, du fait de leur très forte porosité par rapport à une couche de même nature obtenue par dépôt selon d'autres techniques classiques (PVD, IBS, CVD). Cette forte porosité permet de greffer en trois dimensions de fortes concentrations de molécules biologiques, et par là même, d'augmenter significativement le signal de fluorescence. De plus, compte tenu de l'efficacité du greffage volumique des couches de matériau sol-gel, l'épaisseur de matériau sol-gel à déposer sur le substrat est inférieure à celle des gels classiquement employés dans l'art antérieur. L'épaisseur des couches mises en œuvre par l'invention peut ainsi varier, selon la nature de la couche déposée et la densité de sondes à y greffer, de 0,1 à 5 μm . Ces couches peuvent être déposées en une ou plusieurs étapes selon les techniques décrites plus loin. On se situe donc dans le domaine des couches minces, contrairement à l'art antérieur qui utilisait des couches épaisses (supérieures à 20 μm , nominalement 30 μm).

On va donc pouvoir exploiter les caractéristiques optiques des couches minces sol-gel déposées sur le substrat. Ces caractéristiques optiques des couches minces vont également pouvoir être optimisées de manière à augmenter le signal de fluorescence détecté après greffage de la molécule marquée sur ou dans la couche sol-gel en question.

Avantageusement, par le choix des précurseurs et de la voie de synthèse de la couche

mince de matériau sol-gel, on peut obtenir une fluorescence intrinsèque de la couche très faible aux longueurs d'onde d'intérêt, c'est à dire aux longueurs d'onde d'excitation que l'on enverra plus tard sur le
5 dispositif pour étudier la fluorescence des fluorophores fixés dans ou à la surface de la couche mince.

De plus, la couche de matériau sol-gel peut présenter une faible absorption dans l'UV et dans le
10 domaine visible, ce qui permet de limiter la contribution des pertes non-radiatives. Il en découle une amélioration du bilan énergétique en faveur de l'émission de fluorescence dans l'espace libre. Avec cette caractéristique, la quantité de lumière émise est
15 supérieure par rapport à l'art antérieur. Les signaux recueillis par les scanners de lecture des biopuces issus de l'invention vont donc bénéficier d'un rapport signal à bruit amélioré.

Par ailleurs, la couche sol-gel peut avoir
20 avantageusement une faible rugosité de surface, ce qui permet de limiter la diffusion de la lumière de fluorescence.

Pour ces trois premiers points, les couches minces sol-gel utilisées par la présente invention
25 apportent une amélioration des performances par rapport à l'art antérieur. En disposant une couche mince de matériau sol-gel sur le substrat, on augmente donc le signal de fluorescence.

30 Selon un mode de réalisation particulier, le support selon l'invention comprend en outre au moins

une couche mince optique de matériau préparé par voie sol-gel supportée par une deuxième face du substrat opposée à la première face, ladite couche mince supportée par la deuxième face ayant un indice de réfraction inférieur à celui du substrat. En d'autres termes, le dispositif selon l'invention comprend une ou plusieurs couches minces sur une face du substrat et une ou plusieurs couches minces sur la face opposée.

Selon un autre mode de réalisation, le support selon l'invention comprend un empilement de couches minces diélectriques formant un miroir de Bragg intercalé entre le substrat et la couche mince de matériau préparé par voie sol-gel. Cette configuration particulière va permettre d'augmenter le champ excitateur à l'intérieur de la couche mince de matériau sol-gel. Cela est particulièrement intéressant quand on veut étudier la fluorescence de fluorophores greffés dans ou à la surface de la couche de sol-gel, car cette configuration a pour effet d'augmenter l'excitation desdits fluorophores et donc d'augmenter la quantité de lumière émise dans le superstrat. On précise qu'un miroir de Bragg est un empilement successif de plusieurs couches minces diélectriques d'indices de réfraction n_1 et n_2 différents. L'épaisseur de chacune de ces couches est égale à $\lambda/(4n)$, avec n pouvant prendre la valeur n_1 ou n_2 . La variable λ correspond à la longueur d'onde à laquelle on souhaite avoir une réflexion maximale pour le miroir de Bragg.

Les couches de matériau préparé par voie sol-gel sont compatibles avec la plupart des substrats,

minéraux ou organiques, quelles que soient leur nature chimique et leurs propriétés optiques, mécaniques ou thermiques. Avantageusement, le substrat sera formé d'un matériau choisi parmi le groupe comprenant les verres, les polymères et les semi-conducteurs. On peut donc envisager de réaliser des supports de biopuces sur un substrat de verre, de silicium ou de plastique. On pourra bien entendu choisir tout autre matériau, à condition que les couches de matériau sol-gel soient compatibles avec le substrat choisi.

Selon un mode de réalisation particulier, le matériau préparé par voie sol-gel a une composition purement inorganique. Selon un deuxième mode de réalisation, il est composé d'une fraction inorganique et d'une fraction organique.

Si on se trouve dans le cas où le matériau est composé à la fois d'une fraction inorganique et d'une fraction organique, la fraction inorganique sera avantageusement majoritaire par rapport à la fraction organique. Avantageusement, que la fraction inorganique soit majoritaire ou non, ladite fraction donnera sa cohésion au matériau sol-gel.

Que le matériau soit de composition purement inorganique ou à la fois inorganique et organique, ce matériau comportera avantageusement au moins un composé choisi parmi:

- un oxyde M_xO_y , avec M choisi parmi le groupe constitué de Si, Al, Zr, Ti et Ta,
- un composé de type $-M-O-M'-$, avec M et M' choisis parmi le groupe constitué de Si, Al, Zr, Ti et Ta.

On pourra ainsi avoir, par exemple, des matériaux tels que SiO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 et/ou des mélanges de deux ou plus de ces oxydes.

Avantageusement, lorsque le matériau
5 préparé par voie sol-gel comporte un composé de type -
M-O-M'-, M est Si et M' est Zr ou Ti.

Dans ce type de couche, on pourra utiliser
par exemple les sites M-OH libres comme sites réactifs
pour le greffage ultérieur de sondes oligonucléotides,
10 après silanisation de ces sites ou des sondes.

Lorsque le matériau sol-gel est composé
d'une fraction inorganique et d'une fraction organique,
ledit matériau a des caractéristiques particulières.

15 Selon un mode de réalisation particulier,
la fraction organique est un polymère, ledit polymère
restant libre ou étant faiblement lié aux éléments
constituant la fraction inorganique. En particulier, la
fraction organique résulte de l'adjonction d'un
20 polymère organique dans la suspension colloïdale
inorganique destinée à former le matériau sol-gel. En
procédant ainsi, et après les étapes de dépôt et de
gélification du matériau sur le substrat, le polymère
est emprisonné dans les mailles du réseau inorganique.
25 Ce polymère peut avoir plusieurs fonctionnalités qui
sont notamment le remplissage partiel de la porosité
naturelle de la couche, permettant ainsi de moduler la
porosité naturelle de la couche et/ou la taille des
pores, et l'incorporation dans la couche de groupements
30 organiques réactifs permettant le greffage des sondes
oligonucléotides.

Selon un autre mode de réalisation, la fraction organique résulte de l'incorporation d'un silane $X-R_2-Si(OR_1)_n$ dans la fraction inorganique. En particulier, cette incorporation se fait lors de la
5 synthèse du sol et le silane se lie aux sels ou alcoxydes métalliques de la fraction inorganique (on rappelle que le sol désigne une suspension colloïdale de particules dans un liquide). On a alors création d'un réseau composite de type $M-O-Si(R_2X)-O-M-$.

10 Avantageusement, R_1 sera choisi parmi le groupe comprenant $-CH_3$, $-C_2H_5$, nPr , iPr ou tBu , R_2 sera une chaîne aliphatique de longueur $p-CH_2$, de préférence sans fonction éther $-CH_2-O-CH_2-$, et avec p compris entre 2 et 10, et X sera un groupement organique terminal
15 réactif choisi parmi le groupe comprenant $-OH$, $-COOH$, $-CH=O$, $-NH_2$, $-Cl$, $-époxy$, $-glycidoxy$, $-CH=CH_2$, $-acryl$ ou $-méthalcryl$.

Notons que la longueur de la chaîne aliphatique peut servir à moduler la taille des cavités
20 du réseau, dans le but d'accueillir une sonde oligonucléotide de longueur déterminée. Le groupement X quant à lui peut permettre le greffage d'un oligonucléotide lui-même fonctionnalisé.

25 Pour synthétiser les couches de matériau sol-gel selon l'invention, on peut utiliser les étapes classiques d'hydrolyse et de condensation des précurseurs en solution, suivie d'une transition sol/gel.

30 La couche sol-gel est déposée à partir d'un produit liquide qui est une suspension colloïdale des

composés cités ci-dessus, c'est-à-dire constituée d'espèces de taille comprise entre 5 nm et 100 nm.

Cette suspension colloïdale est préparée par hydrolyse suivie d'une condensation contrôlée de sels ou d'alcoxydes de métaux ou de métalloïdes M. Au final, le milieu porteur est un solvant organique afin de faciliter l'étape de dépôt et de séchage du film.

Dans la suspension colloïdale, les éléments présents pourront être des particules sous forme quasi-sphérique ou de plaquettes, des oligomères ou un mélange de particules sur lesquelles seront greffés des oligomères. Dans tous les cas, les particules et/ou les oligomères auront une dimension caractéristique relativement monodisperse et dans la gamme de tailles précisées ci-dessus.

En fait, ce sont la nature, la taille et la forme de ces espèces en suspension qui donneront, après dépôt et gélification, la microstructure de la couche de matériau sol-gel. En effet, ce sont ces espèces qui vont déterminer la porosité totale et la taille des pores de la couche sol-gel. Généralement, la structure de la couche sera de type oligomérique.

En fabriquant le matériau sol-gel, on peut maîtriser la taille des pores de la couche mince de matériau préparé par voie sol-gel. Avantageusement, la couche mince de matériau préparé par voie sol-gel possèdera des pores de tailles comprises entre 5 nm et 100 nm, et une porosité totale comprise entre 1% et 50%.

Il existe différentes méthodes pour optimiser la taille des pores et la porosité totale de la couche sol-gel.

Tout d'abord, pour les couches sol-gel
5 ayant une structure particulière, on peut jouer sur les paramètres suivants :

- la taille des particules, déterminée par les conditions de synthèse du matériau (concentration, taux d'hydrolyse, temps de mûrissement du sol),
- 10 - la forme des particules, déterminée en fonction du précurseur (nature du métal M, nature du sel ou de l'alcoxyde) et des conditions de synthèse du matériau,
- la compacité de l'empilement des particules dans la couche (empilement compact de type sphères dures ou
- 15 chapelet de particules formant un réseau ménageant des cavités d'une certaine dimension permettant d'accueillir les sondes à greffer),
- l'emploi d'un agent de remplissage intimement mélangé ou lié de manière covalente aux particules.

20 Pour les couches sol-gel à structure oligomérique, on pourra jouer sur les paramètres suivants :

- la taille des oligomères,
- la compacité de l'empilement des oligomères et/ou la
- 25 taille naturelle du réseau après gélification,
- la densification éventuelle de la couche après son dépôt par une méthode thermique ou autre,
- l'incorporation dans le réseau de greffons latéraux organiques plus ou moins longs servant d'espaceurs.

30 En jouant sur ces paramètres, on peut maîtriser la taille des pores et la porosité totale de

la couche mince obtenue par voie sol-gel dans les gammes précisées plus haut. Cela permet ainsi de maîtriser la densité de sondes greffées dans une gamme de concentrations très large. On rend donc possible, pour de nombreuses applications spécifiques, la fabrication industrielle de puces étalons ainsi que de puces « sur mesure » permettant de normaliser des signaux de fluorescence entre sondes de natures et/ou de longueurs différentes.

Par ailleurs, en fonction du choix de la matrice sol-gel constituant la couche de matériau sol-gel, on pourra moduler l'indice de réfraction de ladite couche. La couche de matériau sol-gel pourra ainsi avoir un indice de réfraction compris dans la plage 1,2 à 2,1. Cela permet d'optimiser le signal de fluorescence détecté selon la technique de détection employée (microscopie en champ proche ou en champ lointain, ellipsométrie...) et selon le mode de greffage (surfaccique ou volumique). Dans le cas de la présente invention, on obtient des conditions d'élaboration de la couche qui permettent de baisser son indice de réfraction (n) par rapport à l'indice de réfraction du substrat nu. Dans le cadre de la présente invention, il est avantageux de vérifier la relation :

$$n_{\text{(couche sol-gel)}} < n_{\text{(substrat)}}$$

Dans le cas particulier de l'utilisation d'une couche mince de sol-gel sur un multicouche optique (miroir de Bragg), cette relation se généralisera sous la forme suivante :

$$Y_{\text{(couche sol-gel)}} < Y_{\text{(multicouche)}}$$

où Y représente l'admittance optique de l'onde dans la couche mince de matériau sol-gel ou le miroir de Bragg.

Le but du support selon l'invention est de
5 réaliser des biopuces ou tout autre système d'analyse biologique. Pour y arriver, il faut que des molécules biologiques ou bio-molécules soient greffées sur et dans la (les) couche(s) mince(s) obtenue(s) par voie sol-gel selon l'invention. Pour cela, on procède au
10 greffage de molécules biologiques, ou bio-molécules, sur et dans la couche mince de matériau préparé par voie sol-gel sur la première face du support pour biopuce selon l'invention en exécutant les étapes suivantes :

- 15 - on prépare un sol destiné à fournir le matériau sol-gel,
- on incorpore des bio-molécules dans le matériau au cours de sa préparation,
- on greffe des bio-molécules dans le matériau au cours
20 de sa préparation,
- on dépose une couche mince dudit sol sur la première face du substrat,
- on obtient la couche mince de matériau sol-gel à partir de la couche mince de sol.

25 Selon un cas particulier, les bio-molécules incorporées dans le matériau au cours de sa préparation sont des bio-molécules silanisées en vue de leur greffage.

Dans ce cas, l'incorporation des bio-
30 molécules peut se faire de différentes manières.

Selon un premier mode de réalisation,,
l'incorporation des bio-molécules est effectuée par
diffusion dans ladite couche mince lorsque celle-ci est
sous forme de gel sec. Pour procéder au greffage de
5 molécules biologiques sur et dans la couche mince de
matériau préparé par voie sol-gel sur la première face
du support pour biopuce, on pourra procéder de la
manière suivante :

- synthétiser le matériau sol-gel destiné à constituer
10 la couche mince,
- silaniser ou fonctionnaliser les bio-molécules à
greffer,
- déposer le matériau sol-gel sur le substrat sous
forme d'une couche mince,
- 15 - incorporer les bio-molécules dans le gel sec par
diffusion,
- et greffer les bio-molécules sur la matrice sol-gel.

Selon un deuxième mode de réalisation,
l'incorporation des bio-molécules est effectuée dans
20 ladite couche mince lorsque celle-ci est sous forme de
gel humide, le greffage des bio-molécules se réalisant
lors du séchage du gel (on rappelle que le gel désigne
un réseau solide tridimensionnel emprisonnant du
liquide (dans ses mailles)).

25 Selon un troisième mode de réalisation,
l'incorporation des bio-molécules est effectuée dans le
matériau sol-gel à l'état liquide, le greffage des bio-
molécules se réalisant dans le sol. Le sol greffé
n'aura alors plus qu'à gélifier et à sécher lors du
30 dépôt. En d'autres termes, l'incorporation des bio-
molécules est effectuée dans le matériau sol-gel

lorsque celui-ci est sous forme de sol, le greffage des bio-molécules se réalisant dans le sol avant dépôt de la couche mince à l'état liquide.

5 Selon un autre cas particulier, l'étape de préparation du sol inclut une étape de fonctionnalisation destinée à obtenir un matériau sol-gel fonctionnalisé permettant le greffage des bio-molécules après leur incorporation dans la couche
10 mince.

Dans ce cas, l'incorporation des bio-molécules peut se faire de différentes manières.

Selon un premier mode de réalisation, les bio-molécules sont incorporées dans la couche mince
15 lorsque celle-ci est sous forme de gel sec. Pour procéder au greffage de molécules biologiques sur et dans la couche mince de matériau préparé par voie sol-gel sur la première face du support pour biopuce, on pourra procéder de la manière suivante :

- 20 - synthétiser le matériau sol-gel en incluant sa fonctionnalisation en vue du greffage des bio-molécules,
- déposer le matériau sol-gel sur le substrat sous forme d'une couche mince,
25 - incorporer les bio-molécules dans le gel sec,
- et greffer les bio-molécules.

Selon un deuxième mode de réalisation, les bio-molécules sont incorporées dans la couche mince lorsque celle-ci est sous forme de gel humide. Dans ce
30 cas, on pourra procéder au greffage des bio-molécules pendant le séchage du gel.

Selon un troisième mode de réalisation, les bio-molécules sont incorporées dans le matériau sol-gel lorsque celui-ci est sous forme de sol, le greffage des bio-molécules se réalisant dans le sol avant dépôt de la couche mince. Dans ce cas, le greffage des bio-molécules se fera donc avant que le sol ne gélifie et on procédera ensuite au dépôt et au séchage de la couche.

Selon un quatrième mode de réalisation, les bio-molécules étant également fonctionnalisées, leur incorporation et leur greffage sont effectués dans le sol avant son dépôt en couche mince sur le support. Pour procéder à ce greffage particulier, on pourra procéder de la manière suivante :

- synthétiser le matériau sol-gel, incluant sa fonctionnalisation en vue du greffage des bio-molécules,
- fonctionnaliser les bio-molécules,
- incorporer les bio-molécules dans le sol liquide,
- greffer les bio-molécules,
- déposer le sol contenant les bio-molécules greffées sur le support,
- attendre la gélification du sol puis sécher le gel.

Selon un mode particulier de l'invention, on peut structurer la couche de matériau sol-gel et lui donner une configuration particulière. Pour cela, on utilise le procédé de greffage tel que décrit précédemment en lui ajoutant une étape de structuration de la couche mince de matériau sol-gel pour obtenir un réseau de plots ou de cuvettes sur tout ou partie du

support de biopuce. Avantageusement, ces plots ou cuvettes seront de forme circulaire ou carrée.

Avantageusement, les plots ou cuvettes seront de dimension caractéristique comprise entre 10
5 et 200 micromètres, et seront espacés de 50 à 200 micromètres.

Avantageusement, le réseau de plots ou de cuvettes est réalisé en utilisant au moins une des techniques choisies parmi une attaque chimique, un
10 pelage, un micro-usinage de la couche de matériau préparé par voie sol-gel ou par dépôt direct d'une couche structurée de matériau préparé par voie sol-gel par micro-distributions locales. Le choix de la technique de structuration se fera de préférence en
15 fonction des caractéristiques de la couche sol-gel. On regardera en particulier :

- le couplage de la couche sol-gel au substrat et sa tenue mécanique,
- la proportion de la fraction inorganique et de la
20 fraction organique,
- la résistance chimique de la fraction inorganique, principalement aux acides et aux bases minéraux, et de la fraction organique, principalement aux solvants organiques.

25 Si la couche comporte une forte fraction organique photo-réticulable, on pourra utiliser une mise en forme directe ou une révélation par attaque chimique après photo-réticulation à travers un masque. Si l'on utilise une attaque chimique, on pourra par
30 exemple utiliser un protocole de type lift-off. Si la couche de matériau sol-gel est faiblement liée au

substrat, on utilisera de préférence la technique du pelage. Si la couche est de résistance mécanique faible à modérée, on procédera de préférence à un micro-usinage de la couche de matériau préparé par voie sol-gel. Si l'on procède à un dépôt direct de la couche structurée par micro-distributions locales, on pourra utiliser par exemple la technique de jet d'encre (« ink-jet » en anglais) ou de traversée d'une aiguille dans un film liquide (« pin and ring » en anglais).

10

En résumé, la présente invention permet de déposer sur des substrats de différentes natures (verre, polymère ou semi-conducteur) des couches minces à base de SiO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 , ZrO_2 par voie sol-gel. Compte tenu des propriétés optiques particulières de ces couches minces sol-gel (faibles indice de réfraction et coefficient d'extinction) et de leurs propriétés physico-chimiques (porosités, état d'interface), on obtient des signaux de fluorescence qui se distinguent de l'état de l'art. La faible épaisseur de la couche sol-gel déposée sur le substrat, combinée avec un indice de réfraction et un coefficient d'absorption faibles apportent à la couche sa fonctionnalité optique particulière, en plus d'une faculté de greffage accrue.

20

25

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre

30

d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- la figure 1 est un graphique présentant l'évolution du signal de fluorescence provenant d'une biopuce
5 constitué d'un support selon l'invention, en fonction de l'épaisseur de la couche mince de matériau sol-gel disposé sur ledit support,
- la figure 2 est un schéma d'un support selon un cas particulier de l'invention, ledit support étant
10 constitué d'un substrat dont deux faces opposées supportent une couche mince de matériau sol-gel,
- la figure 3 est un schéma représentant un substrat supportant, sur une face, un multicouche sur lequel est déposé une couche mince de matériau sol-gel.

15

EXPOSÉ DÉTAILLÉ D'UN MODE DE RÉALISATION PARTICULIER

Tout d'abord, le comportement en fluorescence d'une monocouche de sol-gel déposée sur une lame de microscope va être optimisé.

- 20 Pour cette expérience, on considère un substrat de verre d'indice 1,52 comportant une couche mince sur laquelle est greffé un fluorophore. Le fluorophore pris en compte est le CY₃ (excitation = 543 nm, émission = 580 nm). Notons que le moment dipolaire
25 de ce type de molécules a tendance à s'orienter de manière parallèle à la surface (voir le document [26]).

L'expérience a été menée pour deux valeurs d'indices de réfraction de la couche mince (1,2 et 1,4), les deux indices étant choisis inférieurs à
30 l'indice du substrat, et pour une ouverture numérique du microscope de 0,5.

On envoie un faisceau laser d'excitation d'intensité I_{ex} sur la couche mince à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore et on observe la fluorescence.

5 Dans ces conditions, le comportement en fluorescence du dispositif selon l'invention en fonction de l'épaisseur de la couche mince suit l'évolution présentée dans la figure 1. Les courbes 1 et 2 représentent respectivement l'intensité totale et
10 l'intensité obtenue pour une ouverture numérique de 0,5 avec un indice $n=1,2$; les courbes 3 et 4 représentent quant à elles respectivement l'intensité totale et l'intensité obtenue pour une ouverture numérique de 0,5 avec un indice $n=1,4$. Conformément à ce qui a été
15 pressenti, la figure 1 indique qu'en choisissant un matériau d'indice plus faible ($n=1,2$), on favorise l'émission de la fluorescence dans le superstrat (milieu incident). On obtient ainsi, dans le cas $n=1,2$ et par rapport à une lame de microscope d'indice $n=1,52$
20 un rendement amélioré d'un facteur 3,5 avec une monocouche de sol-gel d'une centaine de nanomètres d'épaisseur.

Cette couche mince de matériau sol-gel bas
25 indice d'une centaine de nanomètres d'épaisseur, lorsqu'elle est déposée sur les deux faces d'un substrat, permet d'obtenir un renforcement du signal transmis. En effet, les ondes couplées par les fluorophores à l'intérieur du cône d'acceptance
30 subissent une propagation suivant les lois de Descartes. Mais les ondes subissent une réflexion de

Fresnel atténuée en raison de la présence d'un faible indice de réfraction en surface. On peut voir sur la figure 2 que, lorsque l'on envoie un faisceau de lumière 6 sur une face du substrat 5 présentant à sa surface des fluorophores, on obtient une émission 7 dans le superstrat et une émission 8 dans le substrat. Lorsque les fluorophores sont greffés dans une couche mince 9 de matériau sol-gel d'indice inférieur à celui du substrat et déposé sur une des faces du substrat, on obtient une émission 17 dans le superstrat supérieure à l'émission 7 et une émission 18 dans le substrat supérieure à l'émission 8. Dans cette figure et de manière avantageuse, on a déposé une deuxième couche mince 9 de matériau sol-gel sur la face opposée à la face du substrat 5 comportant déjà une première couche 9. La présence de cette couche mince 9 de faible indice par rapport au substrat va entraîner l'apparition d'un phénomène de diminution de la réflexion du faisceau lumineux 6.

20

Selon un autre mode de réalisation, on peut également déposer la couche mince 29 de faible indice de réfraction sur un multicouche optique 28 de type miroir de Bragg (voir sur la figure 3). On remarque alors que le champ excitateur à l'intérieur de la couche mince de sol-gel est augmenté lorsque l'on envoie un faisceau incident 26 sur le support. On a en effet $E_1 < E_2$, avec E_1 et E_2 le champ excitateur respectif du substrat et de la couche mince. Cette configuration particulière permet donc d'augmenter la fluorescence émise dans le superstrat car l'émission 37

30

dans le superstrat est supérieure à l'émission 27 dans le superstrat sans multicouche.

Pour illustrer l'intérêt du dispositif selon l'invention et de ses différentes variantes, on réalise des modélisations en comparant quatre types d'empilements :

- le cas 1 est un substrat seul,
- le cas 2 est un substrat et un empilement de couches minces du type 5(HB) où H est TiO_2 et B est SiO_2 ,
- le cas 3 est un substrat et un empilement de couches minces du type 4(HB) (HB') où B' est un matériau sol-gel d'indice de réfraction $n = 1,3$,
- le cas 4 est un substrat et un empilement de couches minces du type 4(HB) (HB') où B' est un matériau sol-gel d'indice de réfraction $n = 1,22$.

Pour réaliser cette étude, on utilise des fluorophores CY_3 situés à une altitude de 2 nm et orientés de 90° par rapport à la surface du support.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du laser envoyées sur les échantillons sont respectivement de 543nm et de 580nm. On précise que les indices de réfraction de SiO_2 et de TiO_2 sont respectivement de 1,46 et de 2,2, l'indice du superstrat (c'est à dire l'indice du milieu d'arrivée de la lumière) est de 1 et l'indice du substrat est de 1,52. L'ouverture numérique (ON) du microscope utilisé pour l'observation de la fluorescence du microscope est de 0,5.

Les simulations sur le logiciel « fluoplus » du CEA-LETI donnent les résultats suivants :

	Champ Excitateur (unité arbitraire)	Intensité dans une ON de 0,5 (unité arbitraire)	Intensité dans le superstrat (unité arbitraire)
Cas 1	0,63	0,03	0,10
Cas 2	3,02	0,73	2,04
Cas 3	3,25	0,86	2,44
Cas 4	3,33	0,92	2,64

Si l'on compare ces résultats en prenant le cas 1 comme
5 référence, on obtient :

	Champ Excitateur (unité arbitraire)	Intensité dans une ON de 0,5 (unité arbitraire)	Intensité dans le superstrat (unité arbitraire)
Cas 1	1	1	1
Cas 2	5	27	20
Cas 3	5	32	24
Cas 4	5	34	26

De ces résultats, on en conclut qu'avec un sol-gel
d'indice plus faible que la silice, on augmente
l'émission totale de fluorescence sans modifier
10 l'intensité d'excitation (« bleaching » en anglais), et
que ce phénomène est encore accentué si on intercale un
traitement optique de type miroir de Bragg entre le
substrat et la couche bas indice de surface. Cela
constitue un élément important par rapport à l'art
15 antérieur.

Pour illustrer la présente invention, nous allons maintenant détailler un mode de réalisation basé sur le greffage covalent de sondes d'oligonucléotides sur une couche mince de silice réalisée par voie sol-gel.

On réalise dans un premier temps le matériau sol-gel en appliquant les étapes classiques d'hydrolyse et de condensation des précurseurs en solution, suivie d'une transition sol/gel tel qu'explicité précédemment.

Le matériau sol-gel étant réalisé à partir d'une solution traitante liquide, on pourra l'appliquer en une couche mince et de manière homogène sur la totalité du substrat par l'une quelconque des techniques suivantes :

- trempé ou trempage-retrait,
- centrifugation,
- enduction à l'horizontale de type « meniscus coating », c'est à dire par dépôt par tirage,
- pulvérisation.

La faible viscosité et l'homogénéité des solutions traitantes permettent également de mettre en œuvre les techniques de micro-distribution dites de « spotting », c'est à dire de dépôt de gouttes de liquide de volume compris entre quelques dizaines et quelques centaines de picolitres. Une autre technique applicable est une adaptation de l'« ink jet coating ». On pourra donc également réaliser les plots de matériau sol-gel directement sur le substrat par distribution locale. Cette procédure est particulièrement intéressante si on utilise la voie de greffage selon le

principe du micro-réacteur. De plus, elle supprime l'étape de structuration d'une couche déposée sur l'ensemble de la biopuce et peut permettre de déposer localement sur des plaques à puits.

5

Une fois la couche mince déposée sur le substrat, on peut avoir à structurer ladite couche mince, le but étant au final de créer sur la biopuce des plots ou des cuvettes, de géométrie circulaire ou carrée, de dimensions comprises entre 10 et 200 μm et espacées de 50 à 200 μm .

Dans le cas d'une micro-distribution locale selon les techniques de « spotting » ou « d'ink jet coating », la structuration de la couche mince résulte directement du dépôt. Les conditions du dépôt telles que la préparation du substrat, la taille et l'espacement des micro-gouttelettes, le séchage et la gélification sont étudiées pour que les gouttelettes ne coalescent pas avant gélification et pour qu'elles aient la dimension souhaitée une fois gélifiées.

Dans le cas où la couche sol-gel est d'abord déposée sur l'intégralité du substrat, selon une des techniques énumérées précédemment, la structuration sera obtenue, selon la nature physico-chimique de la couche et selon ses propriétés mécaniques, par l'une des techniques suivantes :

- une attaque chimique, par exemple selon un protocole de type lift-off utilisant un masque d'insolation, éventuellement une couche sacrificielle, un acide ou une base minérale, et un solvant aqueux ou organique,

- dans le cas d'une couche peu dense et/ou faiblement liée au substrat, on effectue un simple pelage mécanique de la couche à l'aide d'un masque adhésif permettant d'obtenir, en une opération, un réseau de micro-plots sur toute la puce,
- un micro-usinage automatisé, dans le cas d'une couche de résistance mécanique faible à modérée,
- dans le cas d'une couche comportant une forte fraction organique photo-réticulable, on pourra utiliser une mise en forme directe ou une révélation par attaque chimique après photo-réticulation à travers un masque.

Passons maintenant à l'étape de préparation de la sonde. Sur la sonde d'oligonucléotide N, on va greffer le fluorophore F et le greffon G qui peut être un silane S ou une séquence organique R1.

Dans le cas du greffage d'un silane s'écrivant $Y-R_2-Si(OR')_n$, le silane S se greffe sur la sonde N via le groupement réactif Y. Ce groupement réactif Y peut être électrophile ou nucléophile, et il réagit avec un groupement réactif présent sur la sonde.

La sonde N silanisée peut ensuite être greffée sur la matrice sol-gel par condensation de la partie terminale $-Si(OR')_n$ avec les silanols résiduels présents dans le réseau préformé de la matrice sol-gel. Ce greffage peut être réalisé par incorporation de la biomolécule silanisée dans la couche déposée et séchée (gel sec). Dans ce cas, on est tributaire de la diffusion de la biomolécule dans le gel. La forte

porosité de la couche permet néanmoins une diffusion et une densité de greffage relativement rapide.

Pour augmenter la vitesse de diffusion et la densité de sondes greffées, on peut opérer avant que
5 le gel ne soit trop sec, le solvant encore emprisonné dans les cavités facilitant la répartition de la sonde dans tout le volume de la matrice sol-gel.

Enfin, on peut tenter d'incorporer la sonde silanisée à l'état liquide dans la suspension
10 colloïdale, puis réaliser le dépôt de cette substance sur le substrat. Cette technique permet d'avoir un mélange intime, à l'échelle moléculaire, entre la suspension colloïdale et les sondes, d'optimiser la quantité de sondes greffées et de garantir une densité
15 de sondes greffées homogène dans tout le volume de la couche.

Une variante de réalisation est de silaniser d'abord le matériau sol-gel lors de la préparation de la suspension colloïdale ou après dépôt
20 de la couche, puis d'incorporer la sonde dans le gel sec, le gel humide ou la suspension colloïdale. Le greffage se fait alors par une réaction de condensation organique.

Le choix entre les deux variantes dépendra,
25 au cas par cas, de la facilité de greffage:

- du silane sur la sonde,
- du silane ou de la sonde silanisée sur la matrice sol-gel,
- de la sonde sur la matrice sol-gel silanisée.

Dans le cas du greffage sur la sonde d'une séquence organique R1, celle-ci doit comporter deux groupements réactifs Y1 et Y2. Le groupement réactif Y2 réagira avec un groupement réactif X1 de la sonde, tandis que le groupement réactif Y2 réagira avec un groupement réactif X2 du matériau sol-gel. La séquence organique R1 sert donc ainsi d'agent de couplage entre la matrice sol-gel et la biomolécule.

Le groupement réactif X2 sera l'un de ceux cités plus haut dans la description des couches sol-gel composites inorganique/organique.

De même que pour la silanisation, on pourra choisir la méthode de greffage de R1 à la biomolécule et à la matrice sol-gel qui optimise le rendement et la densité finale.

Le greffage des sondes d'oligonucléotides N sur une couche de sol-gel comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, on procède à l'hydroxylation des sondes d'oligonucléotides N en solution basique. Puis on les silanise avec un composé dérivé d'un triéthoxy silane qui permet la formation de liaisons Si-O-Si entre le substrat et le silane de la sonde. La fonction terminale du silane est choisie de manière à pouvoir lier de façon covalente un oligonucléotide modifié en 5' par un groupement amino par exemple (on pourra choisir un aldéhyde par exemple). Enfin, on procède au greffage covalent des oligonucléotides sur la couche de matériau sol-gel. Dans cet exemple de réalisation, des sondes de 20 mères modifiées en position 5' par un bras

NH₂ sont déposées en solution dans un tampon phosphate 0,3M avec une concentration de 10 µM.

Les sondes déposées sur les couches de sol-gel sont hybridées avec des cibles de concentration 0,1 µM de
5 séquence complémentaire portant le groupement fluorophore CY₃ en position 5'.

La biopuce étant maintenant réalisée, on observe sa fluorescence sur un scanner confocal GS
10 3000. En mesurant le signal de fluorescence provenant, d'une part, de sondes hybridées sur du verre de l'état de l'art et, d'autre part, de la biopuce réalisée selon l'invention (c'est à dire un substrat de verre comportant une couche mince de sol-gel), on constate
15 que, d'un point de vue quantitatif, les lames de verre traitées avec une couche sol-gel présentent un gain de 1,5 à 2 par rapport au verre de l'état de l'art.

BIBLIOGRAPHIE

- 5 [1] RAMSAY G., "DNA chips: state of the art", Nature
Biotechnol., 16, 40-44 (1998).
- [2] PEASE A. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA
91, 5022-5026 (1994).
- 10 [3] Brevet WO9427719A1, délivré le 08/12/1994.
- [4] Brevet FR9902819, déposé le 08/03/1999.
- [5] E.D. SOUTHERN, V. MASKOS, NAR 21, 2267 (1993).
- 15 [6] ZAMMATTEO N., Anal. Biochem, 253, 180-189 (1997).
- [7] SCHENA M., Science, 270, 467-470 (1995).
- 20 [8] ALLEMAND J.F., Biophys. J., 73, 2064-2070 (1997).
- [9] JOOS B., Natur Genet. (suppl), 21, 10-14 (1997).
- [10] RASMUSSEN S. R., Anal. Biochem., 198, 138-142
25 (1991).
- [11] SCHENA M., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93, 10614-
10619 (1996).
- 30 [12] LAMTURE J.B., NAR 22, 2121-2125 (1994).

- [13] MicamTM CEA-LETI: Réalisation de puces à ADN par electropolymérisation localisée de sondes oligonucléotidiques greffées sur un polymère conducteur.
- 5 [14] KRAPKO K.A., FEBS Letters., 258, 118-122 (1989).
- [15] YERSHOV G., Proc. Natl. Acad. Sci. (1996).
- 10 [16] EdN Timofeev, NAR 24, n°16, 3142-3148 (1996).
- [17] MIRZABEKOV A., Annal Biotec 2000 Feb 15, 278(2):123-31.
- 15 [18] MIRZABEKOV A., Biotechniques 2000 Oct, 29(4):844-8, 850-2.
- [19] brevet US5981734, « Methods for immobilizing nucleic acids on a gel substrate ».
- 20 [20] BRENNAN J.D., Applied spectroscopy, 53-3 (1999).
- [21] BRENNAN J.D., Chem Materials, 12, 3695-3704 (2000).
- 25 [22] KHAN I., Biochemistry, 39, 16099-16109 (2000).
- [23] LAN E.H., Chem Mat, 12, 1874-1878 (2000).
- 30 [24] PREININGER C., Talenta, 52, 921-930 (2000).

[25] CHIA Sn, J..Am.Chem.Soc., 122, 6488-6489 (2000).

[26] BARRICAULT P. et al., Applied Optics, 41, N°22,
4732-4738, août 2002.

REVENDICATIONS

1. Support pour biopuce comprenant un substrat (5,25) supportant, sur une première face, au moins une couche poreuse de matériau, ladite couche étant destinée à assurer la fixation de molécules biologiques sur ladite couche et dans son volume, ledit support étant caractérisé en ce que ladite couche est une couche mince (9,29) optique de matériau préparé par voie sol-gel et dont l'indice de réfraction est inférieur à l'indice de réfraction du substrat (5,25).

2. Support pour biopuce selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une couche mince (9,29) optique de matériau préparé par voie sol-gel supportée par une deuxième face du substrat (5,25) opposée à la première face, ladite couche mince supportée par la deuxième face ayant un indice de réfraction inférieur à celui du substrat.

3. Support pour biopuce selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un empilement (28) de couches minces diélectriques formant un miroir de Bragg intercalé entre le substrat (25) et la couche mince (29) de matériau préparé par voie sol-gel.

4. Support pour biopuce selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le substrat (5,25) est formé d'un matériau choisi parmi le

groupe comprenant les verres, les polymères et les semi-conducteurs.

5 5. Support pour biopuce selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le matériau préparé par voie sol-gel a une composition purement inorganique.

10 6. Support pour biopuce selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le matériau préparé par voie sol-gel est composé d'une fraction inorganique et d'une fraction organique.

15 7. Support pour biopuce selon la revendication 6, caractérisé en ce que la fraction inorganique est majoritaire par rapport à la fraction organique.

20 8. Support pour biopuce selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que la fraction inorganique donne sa cohésion au matériau sol-gel.

25 9. Support pour biopuce selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que ledit matériau comporte au moins un composé choisi parmi:

- un oxyde M_xO_y , avec M choisi parmi le groupe constitué de Si, Al, Zr, Ti et Ta,

30 - un composé de type $-M-O-M'-$, avec M et M' choisis parmi le groupe constitué de Si, Al, Zr, Ti et Ta.

10. Support pour biopuce selon la revendication précédente, caractérisé en ce que, lorsque le matériau préparé par voie sol-gel comporte un composé de type $-M-O-M'-$, M est Si et M' est Zr ou
5 Ti.

11. Support pour biopuce selon la revendication 6, caractérisé en ce que la fraction organique est un polymère, ledit polymère restant libre
10 ou étant faiblement lié aux éléments constituant la fraction inorganique.

12. Support pour biopuce selon la revendication 6, caractérisé en ce que la fraction
15 organique résulte de l'incorporation d'un silane $X-R_2-Si(OR_1)_n$ dans la fraction inorganique.

13. Support pour biopuce selon la revendication précédente, caractérisé en ce que :
20 - R_1 est choisi parmi le groupe comprenant $-CH_3$, $-C_2H_5$, nPr, iPr ou tBu,
- R_2 est une chaîne aliphatique de longueur p- CH_2 , de préférence sans fonction éther $-CH_2-O-CH_2-$, et avec p compris entre 2 et 10,
25 - X est un groupement organique terminal réactif choisi parmi le groupe comprenant $-OH$, $-COOH$, $-CH=O$, $-NH_2$, $-Cl$, $-époxy$, $-glycidoxy$, $-CH=CH_2$, $-acryl$ ou $-méthacryl$.

14. Support pour biopuce selon l'une
30 quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite couche mince (9,29) de matériau

préparé par voie sol-gel possède des pores de tailles comprises entre 5 nm et 100 nm, et une porosité totale comprise entre 1% et 50%.

- 5 15. Procédé de greffage de molécules biologiques, ou bio-molécules, sur et dans la couche mince (9,29) de matériau préparé par voie sol-gel sur la première face du support (5,25) pour biopuce selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé
- 10 en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- préparation d'un sol destiné à fournir le matériau sol-gel,
 - incorporation des bio-molécules dans le matériau au cours de sa préparation,
 - 15 - greffage des bio-molécules dans le matériau au cours de sa préparation,
 - dépôt d'une couche mince dudit sol sur la première face du substrat,
 - obtention de la couche mince de matériau sol-gel à
 - 20 partir de la couche mince de sol.

16. Procédé de greffage selon la revendication précédente, caractérisé en ce que les bio-molécules incorporées dans le matériau au cours de

25 sa préparation sont des bio-molécules silanisées en vue de leur greffage.

17. Procédé de greffage selon la revendication précédente, caractérisé en ce que

30 l'incorporation des bio-molécules est effectuée par

diffusion dans ladite couche mince lorsque celle-ci est sous forme de gel sec.

18. Procédé de greffage selon la
5 revendication 16, caractérisé en ce que l'incorporation des bio-molécules est effectuée dans ladite couche mince lorsque celle-ci est sous forme de gel humide, le greffage des bio-molécules se réalisant lors du séchage du gel.

10

19. Procédé de greffage selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'incorporation des bio-molécules est effectuée dans le matériau sol-gel lorsque celui-ci est sous forme de sol, le greffage
15 des bio-molécules se réalisant dans le sol avant dépôt de la couche mince à l'état liquide.

20. Procédé de greffage selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'étape de
20 préparation du sol inclut une étape de fonctionnalisation destinée à obtenir un matériau sol-gel fonctionnalisé permettant le greffage des bio-molécules après leur incorporation dans la couche mince.

25

21. Procédé de greffage selon la revendication précédente, caractérisé en ce que les bio-molécules sont incorporées dans la couche mince lorsque celle-ci est sous forme de gel sec.

30

22. Procédé de greffage selon la revendication 20, caractérisé en ce que les bio-molécules sont incorporées dans la couche mince lorsque celle-ci est sous forme de gel humide.

5

23. Procédé de greffage selon la revendication 20, caractérisé en ce que les bio-molécules sont incorporées dans le matériau sol-gel lorsque celui-ci est sous forme de sol, le greffage des
10 bio-molécules se réalisant dans le sol avant dépôt de la couche mince.

24. Procédé de greffage selon la revendication 20, caractérisé en ce que, les bio-
15 molécules étant également fonctionnalisées, leur incorporation et leur greffage sont effectués dans le sol avant son dépôt en couche mince.

25. Procédé de greffage selon l'une
20 quelconque des revendications 15 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de structuration de la couche mince de matériau sol-gel pour obtenir un réseau de plots ou de cuvettes sur tout ou partie du support de biopuce.

25

26. Procédé de greffage selon la revendication précédente, caractérisé en ce que lesdits plots ou cuvettes sont de dimension caractéristique comprise entre 10 et 200 micromètres, et sont espacés
30 de 50 à 200 micromètres.

27. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que le réseau de plots ou de cuvettes est réalisé en utilisant au moins une des techniques choisies parmi une attaque chimique, un pelage, un
5 micro-usinage de la couche de matériau préparé par voie sol-gel ou par dépôt direct d'une couche structurée de matériau préparé par voie sol-gel par micro-distributions locales.

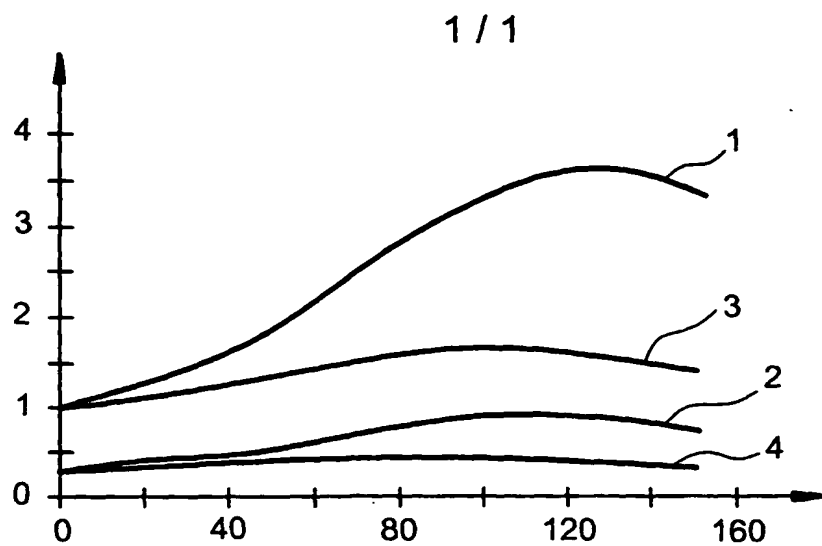


FIG. 1

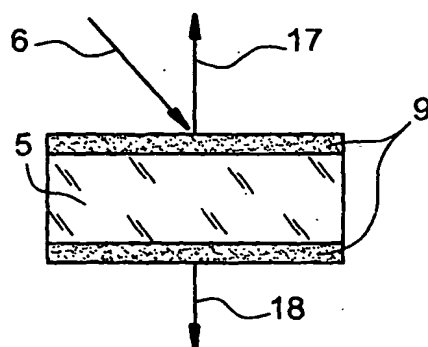
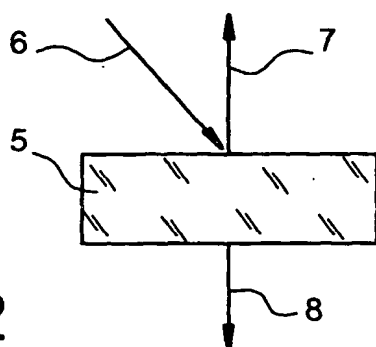
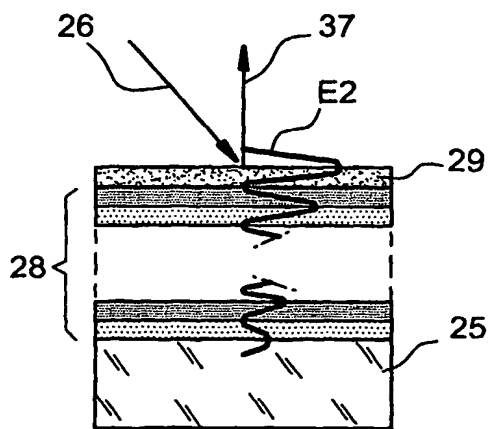
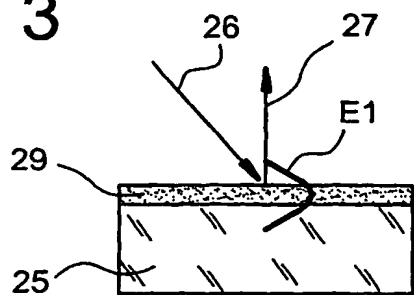


FIG. 2

FIG. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/543 B01J19/00 G02B1/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01J G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/48691 A (BARRITAUPT PIERRE ;COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); CHATON PATR) 20 June 2002 (2002-06-20) the whole document	1,3-5,9
X	WO 02/50540 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;CHATON PATRICK (FR); VINET FRANCOIS) 27 June 2002 (2002-06-27) the whole document	1,3-5,9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 2004

Date of mailing of the international search report

30/09/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/001088

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INNOCENZI P ET AL: "Optical and surface properties of inorganic and hybrid organic-inorganic silica-titania sol-gel planar waveguides" JOURNAL OF NON-CRYSTALLINE SOLIDS, NORTH-HOLLAND PHYSICS PUBLISHING. AMSTERDAM, NL, vol. 259, no. 1-3, 2 November 1999 (1999-11-02), pages 182-190, XP004364388 ISSN: 0022-3093 the whole document	1,4-10, 12,13
X	US 6 303 290 B1 (LIU DEAN-MO ET AL) 16 October 2001 (2001-10-16)	15,20, 23,24
Y	column 3, line 10 - column 4, line 44	16-19, 21,22, 25-27
A	WO 02/057810 A (UNIV MONTPELLIER II ;ETIENNE PASCAL (FR); CENTRE NAT RECH SCIENT () 25 July 2002 (2002-07-25) abstract	1-14
A	WU G ET AL: "A novel route to control refractive index of sol-gel derived nano-porous silica films used as broadband antireflective coatings" MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING B, ELSEVIER SEQUOIA, LAUSANNE, CH, vol. 78, no. 2-3, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 135-139, XP004227455 ISSN: 0921-5107 abstract	1-14
Y	US 6 048 695 A (BRADLEY ALLAN ET AL) 11 April 2000 (2000-04-11) the whole document	16-19, 21,22, 25-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/001088

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0248691	A	20-06-2002	FR 2818378 A1	21-06-2002
			EP 1346203 A1	24-09-2003
			WO 0248691 A1	20-06-2002
			US 2004092028 A1	13-05-2004
WO 0250540	A	27-06-2002	FR 2818382 A1	21-06-2002
			EP 1344062 A1	17-09-2003
			WO 0250540 A1	27-06-2002
			JP 2004516477 T	03-06-2004
			US 2004029162 A1	12-02-2004
US 6303290	B1	16-10-2001	NONE	
WO 02057810	A	25-07-2002	EP 1225458 A1	24-07-2002
			CA 2434660 A1	25-07-2002
			WO 02057810 A2	25-07-2002
			JP 2004523784 T	05-08-2004
			US 2004071426 A1	15-04-2004
US 6048695	A	11-04-2000	AU 770695 B2	26-02-2004
			AU 3786199 A	23-11-1999
			CA 2326684 A1	11-11-1999
			EP 1075544 A1	14-02-2001
			JP 2002513814 T	14-05-2002
			WO 9957323 A1	11-11-1999
			US 2002006623 A1	17-01-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/001088

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/543 B01J19/00 G02B1/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N B01J G02B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 02/48691 A (BARRITAUPT PIERRE ;COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); CHATON PATR) 20 juin 2002 (2002-06-20) le document en entier -----	1,3-5,9
X	WO 02/50540 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;CHATON PATRICK (FR); VINET FRANCOIS) 27 juin 2002 (2002-06-27) le document en entier ----- -/--	1,3-5,9

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 septembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/09/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Diez Schlereth, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mande Internationale No

PCT/FR2004/001088

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>INNOCENZI P ET AL: "Optical and surface properties of inorganic and hybrid organic-inorganic silica-titania sol-gel planar waveguides" JOURNAL OF NON-CRYSTALLINE SOLIDS, NORTH-HOLLAND PHYSICS PUBLISHING. AMSTERDAM, NL, vol. 259, no. 1-3, 2 novembre 1999 (1999-11-02), pages 182-190, XP004364388 ISSN: 0022-3093 le document en entier</p>	1,4-10, 12,13
X	<p>US 6 303 290 B1 (LIU DEAN-MO ET AL) 16 octobre 2001 (2001-10-16)</p>	15,20, 23,24
Y	<p>colonne 3, ligne 10 - colonne 4, ligne 44</p>	16-19, 21,22, 25-27
A	<p>WO 02/057810 A (UNIV MONTPELLIER II ;ETIENNE PASCAL (FR); CENTRE NAT RECH SCIENT () 25 juillet 2002 (2002-07-25) abrégé</p>	1-14
A	<p>WU G ET AL: "A novel route to control refractive index of sol-gel derived nano-porous silica films used as broadband antireflective coatings" MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING B, ELSEVIER SEQUOIA, LAUSANNE, CH, vol. 78, no. 2-3, 15 décembre 2000 (2000-12-15), pages 135-139, XP004227455 ISSN: 0921-5107 abrégé</p>	1-14
Y	<p>US 6 048 695 A (BRADLEY ALLAN ET AL) 11 avril 2000 (2000-04-11) le document en entier</p>	16-19, 21,22, 25-27

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements n° aux membres de familles de brevets

mande Internationale No

PCT/FR2004/001088

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0248691	A	20-06-2002	FR 2818378 A1	21-06-2002
			EP 1346203 A1	24-09-2003
			WO 0248691 A1	20-06-2002
			US 2004092028 A1	13-05-2004
WO 0250540	A	27-06-2002	FR 2818382 A1	21-06-2002
			EP 1344062 A1	17-09-2003
			WO 0250540 A1	27-06-2002
			JP 2004516477 T	03-06-2004
			US 2004029162 A1	12-02-2004
US 6303290	B1	16-10-2001	AUCUN	
WO 02057810	A	25-07-2002	EP 1225458 A1	24-07-2002
			CA 2434660 A1	25-07-2002
			WO 02057810 A2	25-07-2002
			JP 2004523784 T	05-08-2004
			US 2004071426 A1	15-04-2004
US 6048695	A	11-04-2000	AU 770695 B2	26-02-2004
			AU 3786199 A	23-11-1999
			CA 2326684 A1	11-11-1999
			EP 1075544 A1	14-02-2001
			JP 2002513814 T	14-05-2002
			WO 9957323 A1	11-11-1999
			US 2002006623 A1	17-01-2002